

GÖKTÜRK BAYDAR, N., ÇETİN, S., HALLAÇ F. ve BABALIK Z. 2005. Üzümlerde fenolik madde içeriklerinin spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmesi. Türkiye 6. Bağcılık Sempozyumu, Cilt 1, 329-334, Tekirdağ.

Türkiye 6. Bağcılık Sempozyumu,
2005, (1): 329-334

Üzümlerde Fenolik Bileşiklerin Spektrofotometrik Yöntemlerle Belirlenmesi

Nilgün GÖKTÜRK BAYDAR E. Sema ÇETİN Filiz HALLAÇ Zehra BABALIK

ÖZET: Fenolik bileşikler çok farklı kompozisyonlara sahip sekonder metabolitler olup, üzümlerde oldukça fazla miktarlarda bulunmaktadır. Bu araştırmada, üzümün renk, tat, aroma gibi kalite kriterleri üzerine direk etkileri olan fenolik bileşiklerin, spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmesi amaçlanmıştır. Fenolikler antioksidan özellikler gösteren ve sağlık üzerine yararlı etkileri bulunduğu düşünülen bileşiklerdir. Araştırmada, Italia, Hafızali, Çavuş, Kozak beyazı, Alphonse Lavallée, Trakya İlkeren ve Siyah Gemre üzüm çeşitlerine ait olgun taneler kullanılmıştır. Toplam fenolik bileşik miktarı Folin-Ciocalteu yöntemi ile; toplam flavanoller vanillin yöntemi ile; toplam flavonoller Neu solusyonu kullanım yöntemi ile ve kırmızı çeşitlerde antosiyanin miktarları da pH farklılık yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

Araştırma sonucunda çeşitlere ve tane renklerine göre değişmekle birlikte, üzümlerin toplam fenolik bileşik, toplam flavanoller, toplam flavonoller ve antosiyaninler bakımından zengin oldukları ve fenolik bileşiklerin belirlenmesinde spektrofotometrik yöntemlerin başarı ile uygulanabileceği tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Üzüm, fenolik bileşik, flavanol, flavonol, antosiyanin.

DETERMINATION OF GRAPE PHENOLICS BY SPECTROPHOTOMETRIC METHODS

ABSTRACT: Phenolic compounds are seconder metabolites having many different compositions and grapes contain large amounts of these compounds. The objective of this study was to determinate the contents of phenolic compounds which are effective on the quality criteries of grapes such as color, taste and flavour by spectrophotometric methods. Phenolics have been demonstrated to act as antioxidants and are assumed to contribute to the beneficial health effects. In this study, ripening berries of Italia, Hafızali, Çavuş, Kozak beyazı, Alphonse Lavallée, Trakya İlkeren and Siyah Gemre grape cultivars used as plant materials. Different groups of phenolics were determined by using of the following spectrophotometric assays: total phenols by Folin-Ciocalteu, total flavanols by vanillin method, total flavonols by Neu's reagent solution method and anthocyanins by pH differential method (in red grape cultivars).

As a conclusion, although the contents of phenolics changed according to the grape cultivars and the color of the berries, grapes are rich in phenolics. And it was also found that spectrophotometric methods can be used to determinate the phenolics succesfully.

Key Words: Grape, phenolic compounds, flavanol, flavonol, anthocyanin.

GÖKTÜRK BAYDAR, N., ÇETİN, S., HALLAÇ F. ve BABALIK Z. 2005. Üzümlerde fenolik madde içeriklerinin spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmesi. Türkiye 6. Bağcılık Sempozyumu, Cilt 1, 329-334, Tekirdağ.

GİRİŞ

Fenolik bileşikler çok farklı kompozisyonlara sahip sekonder metabolitler olup, genel olarak benzen halkası içeren organik maddeler olarak tanımlanmaktadır. Meyve ve sebzelerin kendilerine has renk, tat, aroma ve dokuya sahip olmalarını sağlayan bu bileşikler, bitki bünyesinde meydana gelen bir çok metabolik olayda önemli roller üstlenmektedirler. Bu roller arasında tür ve çeşitlerin birbirinden ayrılmasına yönelik taksonomik çalışmalar (Gao ve Mazza, 1995), aşı uyumsuzluğu mekanizmasının incelenmesi (Errea ve ark., 1992), üzüm suyu ile şarabın işlenmesi ve depolanması sırasında meydana gelen renk ve tat bozulmaları (Lamikanra ve ark., 1992) ile hastalıklara karşı dayanım çalışmaları (Wade ve Cruickshang, 1992) sayılabilir. Ayrıca fenolik bileşikler insan sağlığı üzerinde de önemli etkilerde bulunmaktadır. Bu etki, doğal bir antioksidan olarak görev almalarından kaynaklanmaktadır. Nitekim antioksidanlar, serbest radikallerin zararlarını, düşük yoğunluklu lipoproteinleri (LDL), lipoprotein oksidasyonunu, platelet agregasyonunu ve kırmızı hücrelerin zararlanmasını önleyerek sağlık üzerinde olumlu etki yapmaktadırlar. Ek olarak fenolik bileşiklerin, kardiovasküler hastalıklara karşı koruyucu etkilerinin bulunduğu (Kushi ve ark., 1995), antimitojen, antikanserojen (Jang ve ark., 1997; Malaveille ve ark., 1998) ve antimikrobiyal (Nychas ve ark., 2003) özelliklere sahip olduğu da yapılan pek çok araştırma ile tespit edilmiştir.

Oldukça geniş ve karmaşık bir aileye sahip olan fenolik bileşikler, başlıca flavonoidler ve nonflavonoidler (fenolik asitler) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadırlar. Flavonoidler, flavan türevleri olarak da tanımlanmakta olup, flavanoller, flavonoller ve antosiyaninlerden oluşmaktadırlar. Nonflavonoidler ise hidroksisinnamat, hidroksibenzoat ve stilbenleri içermektedirler (Lopez Velez ve ark., 2003). Flavonoidler mutlak besin maddesi olarak düşünülmemekle birlikte, antioksidan, antimitojenik ve antikarsinogenik özelliklerinden dolayı insan sağlığını destekleyici bileşikler olarak kabul edilmektedirler (Husain ve ark., 1987; Hertog ve ark., 1993; Hollman ve ark., 1996). Bunlardan özellikle flavonoller bitkilerde UV zararlarından korunma, gövde uzamasının düzenlenmesi, dormansi ve meyve olgunlaşması gibi önemli olaylarda da rol oynamaktadırlar (Park, 2003).

Antosiyaninler ise hemen hemen tüm yüksek yapılı bitkilerde bulunan önemli bir bileşik grubunu oluşturmaktadırlar. Siyanidin, paeonidin, delfinidin, petunidin, malvidin ve pelargonidin, bilinen önemli antosiyaninler içerisinde yer almaktadır. Meyve ve sebzelerin renklenmesi üzerine etkili olup, üzümün kabuk rengi içermiş olduğu antosiyanin miktarına göre belirlenmektedir (Kanellis ve Roubelakis Angelakis, 1993). Kırmızı ve siyah üzüm çeşitleri değişik miktarlarda antosiyanin içerirken beyaz üzüm çeşitlerinde antosiyanin bulunmamaktadır.

Üzüm, fenolik bileşiklerce zengin bir meyve olmasına karşın, bu alanda yapılan çalışmaların büyük bir bölümünün şaraplar üzerinde yoğunlaştığı görülmektedir. Oysa üzümün sofralık olarak büyük miktarlarda tüketimi söz konusudur. Bu nedenle sofralık üzüm çeşitlerinin de farklı gruplar içerisinde yer alan fenolik bileşiklerce incelenmesi büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada farklı üzüm çeşitlerine ait olgunlaşmış tanelerde, maliyetlerinin düşük, uygulamalarının kolay ve tekrarlanabilirliklerinin yüksek olması (Vrhovsek ve ark., 2001) gibi nedenlerle spektrofotometrik yöntemler kullanılarak, toplam fenolik bileşik, toplam flavanoller, toplam flavonoller ve antosiyanin miktarları tespit edilmiştir.

GÖKTÜRK BAYDAR, N., ÇETİN, S., HALLAÇ F. ve BABALIK Z. 2005. Üzümlerde fenolik madde içeriklerinin spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmesi. Türkiye 6. Bağcılık Sempozyumu, Cilt 1, 329-334, Tekirdağ.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Araştırmada bitkisel materyal olarak Italia, Hafızali, Çavuş, Kozak beyazı, Alphonse Lavallée, Trakya İlkeren ve Siyah Gemre üzüm çeşitlerine ait olgun taneler kullanılmıştır. Söz konusu üzüm çeşitleri Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi koleksiyon bağından elde edilmişler, analiz dönemine kadar -20 °C de saklanmışlardır.

Metot

Ekstraksiyon: Araştırmada kullanılan üzüm çeşitlerine ait tanelerde fenolik bileşik ekstraksiyonları Ojeda ve ark. (2002)'nin kullanmış oldukları yöntemle gerçekleştirilmiştir. Daha sonra koyu renkli bir şişeye alınan ekstraktlar, fenolik bileşik analizlerinde kullanılmışlardır. Araştırmada bütün analizler 4 tekerrürlü olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Toplam fenolik bileşik miktarının belirlenmesi: Toplam fenolik bileşik analizleri Folin Ciocalteu kolorimetrik metodu kullanılarak Singleton ve Rossi (1965)'ye göre yapılmıştır. Spektrofotometrede okumalar 765 nm dalga boyunda yapılmıştır. Tanelerdeki toplam fenolik bileşik miktarları gallik asit cinsinden mg/g olarak tespit edilmiştir.

Toplam flavanol miktarlarının belirlenmesi: Toplam flavanoller, vanillin yöntemi ile Butler ve ark. (1982)'na göre gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometrede okumalar 500 nm dalga boyunda yapılmış ve toplam flavanoller kateşin eş değeri olarak mg/g olarak belirlenmiştir.

Toplam flavonol miktarlarının belirlenmesi: Toplam flavonoller, Neu solusyonu kullanım yöntemi ile Dai ve ark. (1995)'na göre yapılmıştır. Spektrofotometrede okumalar 410 nm dalga boyunda yapılmış ve değerler rutin cinsinden mg/g olarak belirlenmiştir.

Antosiyanin miktarlarının belirlenmesi: Kırmızı üzüm çeşitlerinde antosiyanin analizleri Wrostad (1976)'a göre pH farklılık yöntemi ile belirlenmiştir. Spektrofotometrede okumalar 520 ve 700 nm dalga boylarında ve 1.5- 4.0 olmak üzere iki farklı pH derecesinde gerçekleştirilmiştir. Değerler malvidin-3-glikozit cinsinden mg /g olarak belirlenmiştir.

İstatistiksel analizler: Çeşitler arasındaki farklılıkların belirlenmesinde SPSS istatistik programı kullanılmış olup, ortalamalar arasındaki farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma yöntemi ile yapılmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Sofralık olarak tüketilen 7 farklı üzüm çeşidindeki toplam fenolik bileşik, toplam flavanoller, toplam flavonoller ile kırmızı üzüm çeşitleri olan Alphonse Lavallée, Trakya İlkeren ve Siyah Gemre'deki antosiyanin miktarlarının spektrofotometrik yöntemlerle belirlendiği araştırmada elde edilen sonuçlar Çizelge 1'de verilmiştir.

GÖKTÜRK BAYDAR, N., ÇETİN, S., HALLAÇ F. ve BABALIK Z. 2005. Üzümlerde fenolik madde içeriklerinin spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmesi. Türkiye 6. Bağcılık Sempozyumu, Cilt 1, 329-334, Tekirdağ.

Çizelge 1. Çeşitlere göre toplam fenol, flavanol, flavonol ile antosiyanin değerleri (mg/g)

Çeşitler	Toplam fenolik bileşik	Toplam flavanoller	Toplam flavonoller	Antosiyaninler
Italia	2,758 b*	1,174 b	0,225 b	-
Hafızali	2,093 de	1,004 c	0,188 c	-
Çavuş	2,317 c	1,014 c	0,245 b	-
Kozak beyazı	1,957 e	0,916 c	0,118 d	-
Alphonse Lavallée	3,466 a	1,670 a	0,334 a	0,49 a
Trakya İlkeren	2,610 b	1,202 b	0,258 b	0,37 b
Siyah Gemre	2,255 cd	1,028 c	0,184 c	0,25 c

* Her bir sütunda yer alan aynı harfle gösterilen ortalamalar arasında $P \leq 0.05$ düzeyinde istatistiksel bir fark bulunmamaktadır.

Araştırma sonucunda, toplam fenolik bileşik, toplam flavanoller, toplam flavonoller ve antosiyanin miktarları bakımından üzüm çeşitleri arasında istatistiksel olarak önemli farklılıkların bulunduğu belirlenmiştir. Çeşitler arasında en yüksek toplam fenolik bileşik miktarı 3,466 mg/g ile Alphonse Lavallée üzüm çeşidine ait tanelerde tespit edilirken, bu çeşidi sırasıyla Italia, Trakya İlkeren, Çavuş, Siyah Gemre ve Hafızali üzüm çeşitlerinin izlediği saptanmıştır. En düşük toplam fenolik bileşik miktarı ise 1,957 mg/g ile Kozak beyazı üzüm çeşidine ait tanelerde bulunmuştur.

Üzüm çeşitlerinin toplam flavanol içeriklerine ait bulgular incelendiğinde ise, en yüksek ve en düşük değerlere toplam fenolik bileşik içeriğinde olduğu gibi sırasıyla Alphonse Lavallée (1,670 mg/g) ve Kozak beyazı (0,916 mg/g) üzüm çeşitlerinden elde edildiği tespit edilmiştir.

İncelenen bir diğer fenolik bileşik grubu olan toplam flavonollerin miktarlarına bakıldığında, Alphonse Lavallée 0,334 mg/g değeri ile en yüksek toplam flavonol içeriğine sahip çeşit olurken, kapsadığı 0,118 mg/g flavonol miktarı ile de Kozak beyazı son sırada yer almıştır.

Araştırmada ayrıca renkli üzüm çeşitleri olan Alphonse Lavallée, Trakya İlkeren ve Siyah Gemre üzüm çeşitlerine ait tanelerde antosiyanin miktarları da belirlenmiştir. Antosiyanin bulgularının yer aldığı Çizelge 1 incelendiğinde, en yüksek değer diğer fenolik bileşik gruplarında olduğu gibi Alphonse Lavallée (0,49mg/g) çeşidine ait tanelerden tespit edildiği belirlenmiştir. Bu çeşidi sırasıyla Trakya İlkeren (0,37 mg/g) ve Siyah Gemre (0,25 mg/g) çeşitleri izlemiştir.

Fenolik bileşikler bakımından üzüm çeşitleri arasında önemli farklılıklar bulunduğunun belirlendiği araştırmada elde edilen bulgular, farklı gruplara sahip fenolik bileşik miktarlarının çeşitlere göre değiştiğinin belirlendiği diğer araştırma sonuçları ile büyük paralellik göstermektedir (Singleton, 1966; Singleton ve Esau, 1969; Katoka ve ark., 1983; Meyer ve ark., 1997; Brossaud ve ark., 1999). Fenolik bileşik içerikleri bakımından çeşitler arasında görülen farklılıklar, tanenin su kapsamı ve iriliği gibi faktörlerden etkilenebilmektedir. Fenolik bileşikler bakımından çeşitler arasındaki farklılıklara tane iriliği dolaylı olarak etki etmektedir. Nitekim fenolik bileşik konsantrasyonu kabuk yüzeyi ile tane hacmi arasındaki orana göre değişmektedir (Singleton, 1972; Champagnol, 1998).

Farklı gruplara ait fenolik bileşiklerin spektrofotometrik yöntemlerle başarı ile belirlenebileceğinin belirlendiği bu araştırmada, spektrofotometrik yöntemlerin kısa zamanda ve güvenilir sonuçların elde edilmesi bakımından son derece uygun yöntemler olduğu ortaya konulmuştur. Toplam fenolik bileşik, flavanoller ve antosiyanin gibi farklı gruplara ait fenolik bileşikler belirlemek amacıyla HPLC (Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi) ile spektrofotometrik yöntemleri birlikte kullanan Vrhovsek ve ark. (2001), araştırma sonucunda HPLC ve spektrofotometrik yöntemlerden elde edilen sonuçlar arasında son derece iyi bir uyum olduğunu belirlemiştir.

Sonuç olarak, insan sağlığı üzerine yararlı etkilerinin yanı sıra, renk, tat ve aroma gibi kaliteyi etkileyen fenolik bileşikler bakımından üzümün zengin bir meyve olduğu, farklı

GÖKTÜRK BAYDAR, N., ÇETİN, S., HALLAÇ F. ve BABALIK Z. 2005. Üzümlerde fenolik madde içeriklerinin spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmesi. Türkiye 6. Bağcılık Sempozyumu, Cilt 1, 329-334, Tekirdağ.

gruplara ait fenolik bileşiklerin üzüm çeşitlerine göre değiştiği ve bu bileşiklerin belirlenmesinde spektrofotometrik yöntemlerin başarı ile uygulanabileceği belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Brossaud, F., Cheynier, V., Asselin, C., Moutounet, M. 1999. Flavonol compositional differences of grapes among site test plantings of Cabernet Franc. *Am. J. Enol. Vitic*, 50, 227-284.
- Butler, L.G., Price, M.L., Brotherton, J.E. 1982. Vanillin assay for proanthocyanidins (condensed tannins): Modification of the solvent for estimation of the degree of polymerization. *J. Agric. Food Chem.*, 30, 1087–1089.
- Champagnol, F. 1998. Critères de qualité de la vendange. In: *Oenologie, fondements scientifiques et technologies*. C. Flanzy (Ed), pp.653-659. Lavoisier Tec & Doc, Paris.
- Dai, G.H., Andary, C., Mondolot, L., Boubals, D. 1995. Involment of phenolic compounds in the resistance of grapevine callus to Downy mildew (*Plasmopara viticola*). *E. J. Plant Pathol.* 101, 541-547.
- Errea, P., Treutter, D., Feucht, W. 1992. Scion-rootstock effect on the content of flavan 3 in the union of heterografts consisting of Apricots and diverse *Prunus* rootstocks. *Gartenbauwissenschaft*, 57 (3): 134-138.
- Gao, I., Mazza, G. 1995. Characterization quantitation and distribution of anthocyanins and colorless phenolics in sweet cherries. *J. Agric. Food Chem.*, 43 (2):343-346.
- Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H., Putte, B. 1993. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juices. *J. of Agric. Food Chem.*, 41, 1242-1246.
- Hollman, P.C.H., Hertog, M.G.L., Katan, M.B. 1996. Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chem.*, 57 (1): 43-46.
- Husain, S.R., Cillart, J., Cillart, P. 1987. Hydroxy radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochem.*, 26 (9):2489-2491.
- Jang, M.L., Cai, W.C., Udeani, G.O., Slowing, K.V., Thomas, C.F., Beecher, C.W.W., Fong, H.H.S., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Mehta, R.G., Moon, R.C., Pezzuto, J.M. 1997. Cancer chemo-preventative activity of resveratrol, a natural product derived from grapes, *Science*, 275, 218-220.
- Kanellis, A.K., Roubelakis Angelakis, K.A. 1993. Grape in biochemistry of fruit ripening. Chapman & Hall, London, 189-234.
- Katoka, I., Kubo, Y., Sugiura, A., Tomana, T. 1983. Changes in L-phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin synthesis during berry ripening of three grape cultivars. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 52, 273-279.
- Kushi, L.H., Lenart, E.B., Willet, W.C., Sacks, S., Trichopoulou, A., Drescher, G., Ferro Luzzi, A., Helsin, E, Trichopoulos, D. 1995. Mediterranean diet pyramida cultural model for healthy eating, *Am. J. Clin. Nutr.*, 61, 1402-1406.
- Lamikanra, O., Kirby, S.D., Musingo, N. 1992. Muscadinia Grape Polyphenoloxidase: Partical purification by HPLC and some properties. *J. Food Sci.*, 57 (3): 688-695.
- Lopez Velez, M., Martinez Martinez, F., Del Valle- Ribes, C. 2003. The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43 (3): 233-244.
- Malaveille, C., Hautefeuille, A., Pignatelli, B., Talaksa, G., Vineis, P., Bartsch, S. 1998. Antimutagenic dietary phenolics as antigenotoxic substances in urothelium of smokers. *Mutation Research Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 402 (1-2): 219-224.

GÖKTÜRK BAYDAR, N., ÇETİN, S., HALLAÇ F. ve BABALIK Z. 2005. Üzümlerde fenolik madde içeriklerinin spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmesi. Türkiye 6. Bağcılık Sempozyumu, Cilt 1, 329-334, Tekirdağ.

- Meyer, A.S., Yi, O.S., Pearson, D.A., Waterhouse, A.L., Frankel, E.N. 1997. Inhibition of human LDL oxidation in relation to composition of phenolic antioxidant in grape (*Vitis vinifera*). J. Agric. Food Chem., 45, 1638-1643.
- Nychas, G.-J.E., Tassou, C.C., Skandamis, P. 2003. Making the most of herbs, spices and their active components. In: S. Roller (Ed.), Natural antimicrobials for the minimal processing of foods, 176-200.
- Ojeda, H., Andary, C., Kraeva, E., Carbonneau, A., Deloire, A. 2002. Influence of pre-and postveraison water deficit on synthesis and concentration of skin phenolic compounds during berry growth of *Vitis vinifera* cv. Shiraz. Am. J. Enol. Vitic. 53, 4.
- Park, H.J. 2003. Flavonoids from leaves and exocarps of the grape Kyoho. Korean J. Biol. Sci. 7, 327-330.
- Singleton, V.L. 1966. The total phenolic content of grape berries during the maturation of several varieties. Am. J. Enol. Vitic. 17, 126-134.
- Singleton, V.L. 1972. Effects of red wines quality of removing juice before fermentation to simulate variation in berry size. Am. J. Enol. Vitic. 23, 106-113.
- Singleton, V.L., Esau, P. 1969. Phenolic substances in grapes and wine, and their significance. Adv. Food Res. Suppl.1, 282 p. Academic Pres, New York.
- Singleton, V.L., Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Vitic. 16, 144.
- Vrhovsek, U., Mattivi, F., Waterhouse, A.L. 2001. Analysis of red wine phenolics: comparison of HPLC and spectrophotometric methods. Vitis, 40 (2): 87-91.
- Wade, G.C., Cruickshank, R.H. 1992. Rapid development of resistance of wounds mature Apricot fruit to infection with *Monilia fructicola*. J. Phytopathology, 136 (2): 89-94.
- Wrostad, R.E. 1976. Color and pigment analysis in fruit product. Bulletin No. 624. Oregon Agricultural Experiment Station, Corvallis, OR.